

10・2 Hunter 症候群の酵素学的診断に関する検討

大阪大学医学部

藪内百治

岡田伸太郎

豊徹

1974年 Lim & Neufeld らにより heparin から $0-(\alpha-L-idopyranosyluronic\ acid\ \alpha-sulfate)-(1\rightarrow4)-2,5-anhydro-D-[^3H-1]-mannitol-6-sulfate$ が作製され, Hunter 症候群の酵素学的診断が可能となり, 血漿, 白血球, 皮膚線維芽細胞, 羊水, 羊水細胞を用いての Hunter 症候群の酵素学的検索が, あいついで報告されてきた。しかしこの基質を用いての詳細な測定条件についての検討に関しては報告がないため, 日常臨床で用いられる血漿, 白血球, 皮膚線維芽細胞における酵素活性の測定条件を検討した。

方 法

白血球は Dextran-Heparin 法で分離し, 凍結融解により酵素を遊出させ, 25 mM, Tris-HCl 緩衝液 pH 7.5 により一夜透析した。血漿も同じく透析後, 使用に供した。皮膚線維芽細胞も凍結融解後緩衝液で透析し, 酵素液とした。基質 ($\sim 1500\text{cpm}$) $12\mu\text{M}$, 100mM 酢酸緩衝液, 5 mM NaN_3 , 25 μg 牛血清アルブミン, 酵素液を加え, 総量 $50\mu\text{l}$ とし, 37°C , 90~120分反応させた。反応終了後, cellex E-陰イオン交換カラムで生成物を分離し, 放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。

結 果

反応液の至適 pH は白血球, 血漿, fibroblast で夫々 pH3.5, pH4.3, pH4.0 (図1) で, 蛋白量は夫々 25, 300, 8 μg まで直線関係が得られた (図2)。反応時間は 90~120分は直線性を示した (図3)。至的条件下での患者材料の測定では何れも患者で iduronate sulfatase 活性を認めな

かった(表1)。

考 察

我々の用いた条件は Neufeld らの反応条件に比して、酵素蛋白量が少なく、反応時間が短い。また反応生成物を分離するのに陰イオン交換カラムを用いたことが特色である。本法により極めて微量の酵素で短時間に、かつ簡単な操作により iduronate sulfatase 活性の測定が可能となり、出生前診断に対して有力な手段となることが示された。

要 約

Hunter 症候群で欠如する iduronate sulfatase の活性を測定するために、血漿、白血球、皮膚線維芽細胞を用いて諸種酵素学的検討を行い、極めて微量の酵素源を用いる測定方法を開発した。さらに測定操作を簡易化し、患者の診断を容易にした。本法は出生前診断にとっても極めて有力な方法と思われる。

表1 PLASMA, LEUKOCYTE AND SKIN FIBROBLAST
SULFOIDURONATE SULFATASE ACTIVITY

SUBJECT	SULFOIDURONATE SULFATASE*		
	Plasma	Leukocyte	Fibroblast
Hunter 1	0.01	0.08	0
Hunter 2	0	0.08	n.d.**
Hunter 3	0	0	n.d.**
Hunter 4	n.d.**	n.d.**	0
Hunter 5	n.d.**	n.d.**	0
Control	0.19±0.03 (n=8)	9.1±3.3 (n=14)	5.22±2.29 (n=23)

* Activities expressed as nmole substrate hydrolysed/h/mg/ protein
** not determined

Fig 1 Effect of PH in Reaction Mixtures

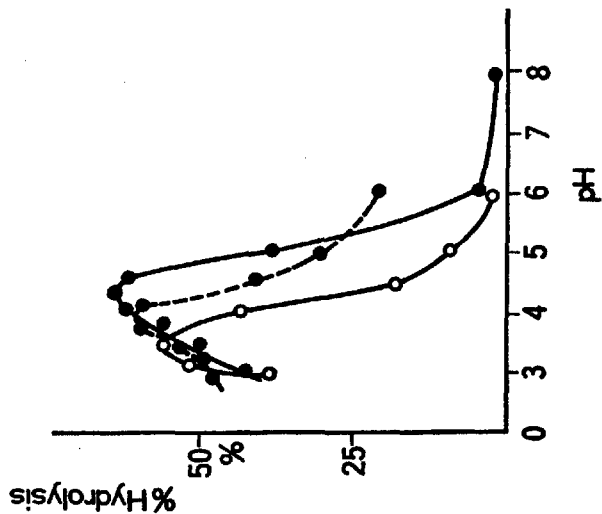
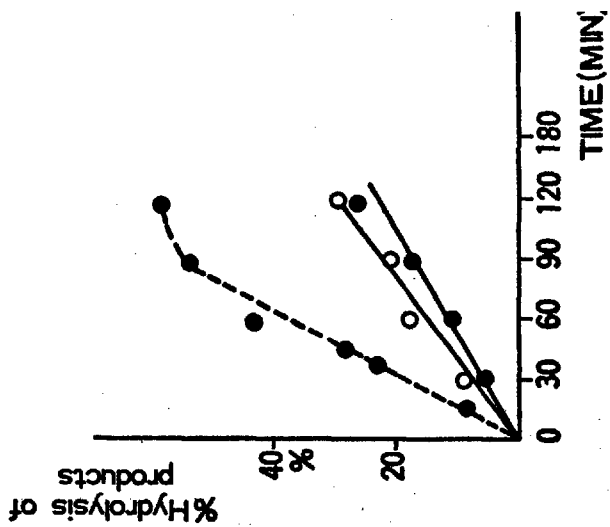
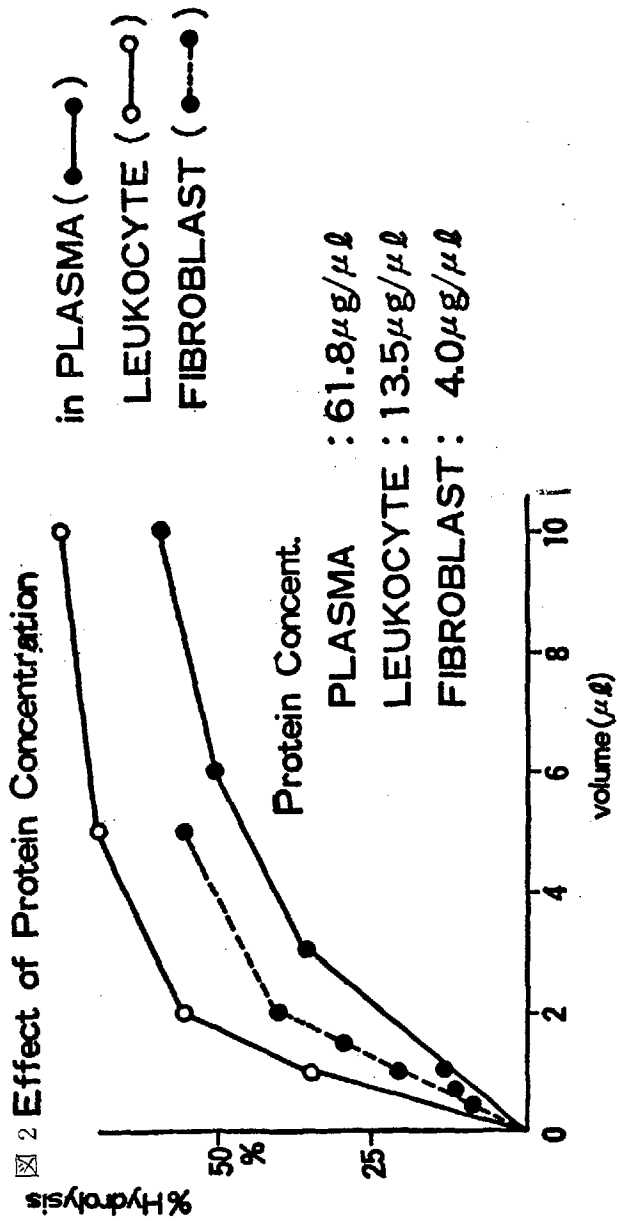
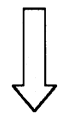


Fig 3 Effect of Incubation Time



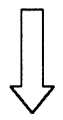


2 Effect of Protein Concentration



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



1974年 Lim & Neufeldらにより heparin から 0-(β -L-idop-yranosyluronic acid β -sulfate)-(1 \rightarrow 4)-2,5-anhydro-D-〔3H-1〕-mannitol-6-sulfate が作製され, Hunter 症候群の酵素学的診断が可能となり, 血漿, 白血球, 皮膚線維芽細胞, 羊水, 羊水細胞を用いての Hunter 症候群の酵素学的検索が, あいついで報告されてきた。しかしこの基質を用いての詳細な測定条件についての検討に関しては報告がないため, 日常臨床で用いられる血漿, 白血球, 皮膚線維芽細胞における酵素活性の測定条件を検討した。